

文章编号: 1006-3080(2026)02-0185-08

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250715001

## 基于药物递送系统的木犀草素脂质体纳米颗粒的可控构建

宋 萌, 岑 莲

(华东理工大学化工学院, 上海 200237)

**摘要:**采用微流体方法, 结合模拟和实验操作开发了一种环形微流控装置, 实现木犀草素脂质体纳米颗粒的成功构建和性能调控。系统性研究操作参数(总流速、相对流速比)对微流控装置混合性能的影响, 以及脂质体纳米颗粒配方(卵磷脂与胆固醇质量比、木犀草素质量浓度)对脂质体粒径和木犀草素包封率的影响, 优化得到了粒径为 220.5 nm、包封率为 64.72% 的木犀草素脂质体纳米颗粒, 该纳米颗粒具有优异的单分散性(多分散指数为 0.037)。以人永生角质形成细胞作为体外吞噬模型, 将其和荧光标记的脂质体纳米颗粒共培养, 证明该递送系统可有效穿过细胞膜屏障, 实现药物的胞内递送。

**关键词:**脂质体纳米颗粒; 微流控; 木犀草素; 细胞摄取; 药物递送

**中图分类号:** TQ460.4

**文献标志码:** A

木犀草素(Luteolin, Lut)是一种天然黄酮类化合物, 广泛存在于全叶青兰、野菊花、金银花等植物中, 长期以来被应用于中药制剂, 具有消炎、抗氧化、抗肿瘤、抗菌等多种药理作用, 已有多项研究报道其在皮肤修复和减轻 UVB(Ultraviolet B Radiation)氧化应激引起的皮肤损伤方面的潜在疗效<sup>[1-6]</sup>。然而, Lut 作为脂溶性药物, 它的水溶性极低, 导致其细胞的摄取受限, 生物利用度较低, 这对其临床应用构成一定挑战<sup>[7-9]</sup>。因此, 改善 Lut 的生物利用度, 尤其是提高其细胞摄取能力, 已成为提升其临床疗效的关键。

脂质体作为一种理想的药物载体, 其形成是一个由分子间非共价相互作用驱动的自发过程: 两亲性的磷脂分子在水中通过疏水作用力驱动, 其疏水尾部为避开水相而相互聚集, 亲水头部则与水分子相互作用, 从而自发排列成磷脂双分子层并进一步弯曲闭合, 最终形成由磷脂双分子层和水相核心组成的囊泡结构。脂质体与细胞膜的磷脂层结构相似, 具有良好的生物相容性, 有望成为 Lut 的理想载体。将 Lut 封装入脂质体, 一方面可提高其水相分散性与化学稳定性, 另一方面脂质体与皮肤细胞膜的

相容性有利于提高药物在皮肤细胞内的摄取与局部递送效率, 从而可能增强其在局部抗炎和抗氧化治疗中的临床效果。

当前, 脂质体的制备方法主要包括薄膜分散法<sup>[10]</sup>、乙醇注入法<sup>[11]</sup>、逆向蒸发法以及微流控法<sup>[12-13]</sup>等。不同制备方法会导致脂质体粒径、单分散性等性质的差异, 而这些性质直接影响脂质体对药物的包封率(Encapsulation Efficiency, EE)以及被细胞摄取的效率, 因此, 选择合适的制备方法对脂质体的性能至关重要。

近年来, 微流控技术作为一种新兴的微流体操控技术, 因其能够连续、可控地制备出粒径均一、单分散性高的颗粒, 已成为微纳颗粒制备的重要技术。与传统制备方法相比, 微流控技术通过对流体混合过程的精确控制, 更易形成结构均一的单层囊泡脂质体, 从而显著提高药物负载效率, 并减少批次间差异<sup>[14]</sup>。基于微流控技术, 本文以模拟和实验相结合的方式, 设计并制备了一种可用于脂质体制备的微流控装置, 并系统研究微流控过程操作参数如总流速(Total Flow Rate, TFR)、水与无水乙醇的流速比

收稿日期: 2025-07-15

作者简介: 宋 萌(2000—), 男, 硕士生, 主要研究方向为生物医用材料。E-mail: Ecustsongmeng@163.com

通信联系人: 岑 莲, E-mail: liancen@ecust.edu.cn

引用本文: 宋 萌, 岑 莲. 基于药物递送系统的木犀草素脂质体纳米颗粒的可控构建[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2026, 52(2): 185-192.

Citation: SONG Meng, CEN Lian. Controlled Fabrication of Luteolin-Loaded Liposomal Nanoparticles for Drug Delivery Systems[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(2): 185-192.

(Flow Rate Ratio, FRR)、卵磷脂与胆固醇质量比(磷脂固醇比, 全文同)等对脂质体纳米颗粒的制备和 Lut 负载的影响, 以优化负载 Lut 的脂质体纳米颗粒(Luteolin Liposomes, Lut Lips)的粒径和包封率。最后, 本文以人永生化角质形成细胞(Human adult Cutaneous Transformed keratinocytes, HaCaT)作为体外吞噬模型, 验证了脂质体作为药物载体的可行性和有效性。

## 1 实验部分

### 1.1 原料和试剂

蛋黄卵磷脂(Egg Phosphatidylcholine, EPC):  $w=98\%$ , 上海麦克林生化科技股份有限公司; 胆固醇(Cholesterol, Chol):  $w=98\%$ , 上海麦克林生化科技股份有限公司; Lut:  $w=98\%$ , 上海麦克林生化科技股份有限公司; 无水乙醇(Ethanol): 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲溶液(Phosphate-Buffered Saline, PBS): 化学纯, 南通飞宇生物科技有限公司; 罗丹明 B(Rhodamine B): 化学纯, 上海笛柏生物科技有限公司。

### 1.2 测试与表征

纳米粒度和 ZETA 电位分析仪(英国 Malvern Panalytical Ltd 公司, Nano-ZSE 型): 分散相设置为水相, 平衡温度  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 平衡时间  $120\text{ s}$ , 单次测试 11 个循环, 每个循环  $10\text{ s}$ , 测试 5 次取平均值。

高效液相色谱仪(HPLC, 日本 Shimadzu Corporation 公司, LC20A 型)检测 Lut Lips 的包封率。色谱条件: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱( $4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), 柱温  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 流速  $1.0\text{ mL/min}$ , 流动相: 甲醇与  $\varphi=0.2\%$  乙酸溶液的混合液(体积比  $55:45$ ) 检测波长  $350\text{ nm}$ ,  $10\text{ }\mu\text{L}$  进样。

场发射透射电子显微镜(TEM, 日本 JEOL 公司, JEM-F200 型)检测 Lut Lips 的形貌特征: 将稀释后的 Lut Lips 悬浮液滴加在碳支持膜上, 静置  $5\text{ min}$  后用吸水纸吸走液滴, 再滴加磷酸钼染色液, 染色  $30\text{ s}$  后用吸水纸吸走染色液。

### 1.3 微流体混合模拟辅助微流控通道设计

微流控聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)装置的设计及制备: 使用 Auto CAD 软件设计微流控通道 3D 模型。通道宽度  $200\text{ }\mu\text{m}$ , 通道高度  $100\text{ }\mu\text{m}$ 。将通道按照结构分为入口混合区和高度混合区两部分, 研究高度混合区对两相流混合效果的影响。

将设计的通道 3D 模型导入多物理场模拟软件

COMSOL Multiphysics 中进行多物理场耦合模拟, 以模拟层流和稀物质传递过程。截取距离装置底部  $50\text{ }\mu\text{m}$  处的横截面用于分析, 考察 TFR 在  $300\sim 804\text{ }\mu\text{L/min}$  范围内混合效果的变化。

采用 PDMS 材料制备微流控装置。首先, 将 PDMS 胶充分混合(预聚物(A)与固化剂(B)的质量比为  $9:1$ ); 再将混合好的 PDMS 胶浇筑在通道刻蚀硅片上, 室温抽真空  $30\text{ min}$  去除气泡, 并在  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  下真空固化  $3\text{ h}$ 。将固化的 PDMS 胶片用无水乙醇冲洗几次, 用切割刀按通道大小进行裁剪; 用等离子清洗机键合印有通道面的胶片和空白胶片, 在  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  下固化  $3\text{ h}$ 。最后将钢针插入微流控通道的出入口, 即可得到装置。

### 1.4 制备 Lut Lips

1.4.1 微流控法制备 Lut Lips 及参数优化 溶液配制: 取 EPC  $100\text{ mg}$ 、Chol  $75\text{ mg}$ 、Lut  $20\text{ mg}$  溶解于  $10\text{ mL}$  无水乙醇中, 得到木犀草素磷脂溶液, 将该溶液作为脂质相溶液; PBS 缓冲溶液( $\text{pH}=7.4$ )作为水相溶液。用  $10\text{ mL}$  注射器吸取脂质相溶液和水相溶液后, 将其分别固定在 2 台微量注射泵上, 通过导管与微流控装置入口连接。先通入脂质相溶液, 待出口端液体稳定后, 再通入水相溶液, 防止水相逆流进入脂质相通道造成装置堵塞。

分别调控 TFR、FRR、Lut 质量浓度和磷脂固醇比, 考察不同条件下微流控装置对脂质体粒径、多分散指数(Polydispersity Index, PDI)以及包封率的控制效果。

使用超滤离心法分离 Lut Lips 和游离 Lut, 将  $5\text{ mL}$  Lut Lips 悬浮液置于  $100\text{ kDa}$  超滤离心管中,  $5000\text{ r/min}$  离心  $20\text{ min}$ , 取  $1\text{ mL}$  滤液测定游离 Lut 质量浓度, 得到 Lut Lips 的包封率 EE。计算公式如下:

$$EE = \frac{\rho_{\text{encap}}}{\rho_{\text{total}}} = \frac{\rho_{\text{total}} - \rho_{\text{unbound}}}{\rho_{\text{total}}} \times 100\% \quad (1)$$

其中,  $\rho_{\text{total}}$  为 Lut Lips 悬浊液中总 Lut 质量浓度,  $\rho_{\text{encap}}$  为 Lut Lips 包封的 Lut 质量浓度,  $\rho_{\text{unbound}}$  为离心滤液中的 Lut 质量浓度。

1.4.2 薄膜分散法制备 Lut Lips 取  $2\text{ mL}$  脂质相溶液装入圆底烧瓶, 置于旋转蒸发仪上, 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下旋蒸  $10\text{ min}$  以上至乙醇完全蒸干, 脂质相在圆底烧瓶内壁上一层薄膜。取下圆底烧瓶, 加入  $12\text{ mL}$  水相溶液, 振摇  $5\text{ min}$ , 置于超声清洗机上超声  $25\text{ min}$  将脂质膜完全水化, 用  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  有机尼龙膜挤出过滤 2 次,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  有机尼龙膜挤出过滤 10 次, 得到薄膜分散法制得的 Lut Lips 样品。

### 1.5 荧光脂质体吞噬实验

取 EPC 100 mg、Chol 33 mg、罗丹明 B 1 mg 溶解于 10 mL 无水乙醇中,得到脂质相溶液;PBS 缓冲溶液 (pH=7.4) 作为水相溶液。在优化条件 (TFR=3000  $\mu\text{L}/\text{min}$ , FRR=4,  $\rho_{\text{EPC}}=10 \text{ mg}/\text{mL}$ ,  $m(\text{EPC}):m(\text{Chol})=3:1$ ) 下制备荧光标记的脂质体纳米颗粒 (Rhodamine B-labeled liposomes, RB-Lips)。

将 RB-Lips 用完全培养基按照培养基与脂质体体积比为 9:1 的比例配制成含 RB-Lips 的培养基。实验共设 3 组:空白对照组、阴性对照组和实验组。空白对照组仅加入完全培养基,不添加任何脂质体;阴性对照组加入相同质量浓度的未标记脂质体(不含罗丹明 B);实验组加入含 RB-Lips 的培养基。细胞接种 24 h 后将完全培养基更换为对应组别的培养基,继续培养 24 h。培养结束后弃去培养基,用 PBS 缓冲溶液冲洗细胞两次后加入 200  $\mu\text{L}$ /孔 PBS 缓冲溶液浸润底部。使用荧光倒置显微镜观测细胞形态以及荧光信号,罗丹明 B 的激发波长为 554 nm,检测波长为 627 nm。

### 1.6 Lut Lips 细胞毒性实验

用 CCK-8 法检测 Lut Lips 的细胞毒性。将 20 mg Lut 溶解在 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中,得到 20 mg/mL 的 Lut 母液。用完全培养基将 Lut 质量浓度分别稀释到 1、0.5、0.25、0.125 mg/mL,将 Lut Lips 按照实际 Lut 质量浓度稀释至对应质量浓度,得到两组含药培养基。

将 HaCaT 细胞培养于含  $\varphi=10\%$  胎牛血清(FBS)的杜氏改良 Eagle(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$  二氧化碳避光培养。当细胞生长到 80%~90% 的汇合度时,弃掉培养基,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含药培养基,培养 24 h。每个实验组设置 4 组平行实验,另设空白组(只含细胞和培养基)和背景组(只含培养基)。培养 24 h 后,弃去含药培养基,用 PBS 缓冲溶液冲洗细胞两次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基和 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液继续培养 1 h,随后使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的光密度(Optical Density, OD)值,按照式(2)计算各组细胞的细胞活力,评估 Lut 和 Lut Lips 对 HaCaT 细胞生物活力的影响。

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{OD}_T - \text{OD}}{\text{OD}_B - \text{OD}} \times 100\% \quad (2)$$

其中,  $\text{OD}_T$  为实验组 OD 值,  $\text{OD}_B$  为空白组 OD 值, OD 为背景组 OD 值。

### 1.7 统计学分析

实验所得数据结果均表示为平均值 $\pm$ 标准差

( $\text{mean}\pm\text{SD}$ )的形式,并采用 Graphpad Prism 9.0 软件作图和进行数据统计分析。采用 one-way ANOVA (Tukey's 多重比较)进行组间差异分析。其中,  $p < 0.05$ , 表示差异具有统计学意义: \*表示  $p < 0.05$ ; \*\*表示  $p < 0.01$ ; \*\*\*表示  $p < 0.001$ ; ns 表示无统计学差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微流体混合模拟结果分析

环形微流控装置混合模拟如图 1 所示,引入的环形结构能实现微流体的均匀混合。

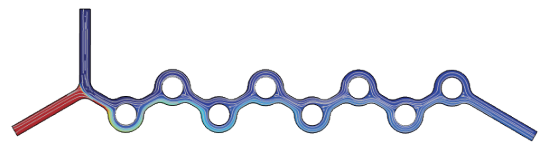


图 1 环形微流控装置混合模拟

Fig. 1 Mixing simulation of the ring-shaped microfluidic device

在微流体流经环形结构时,因两通道阻力的不同产生了流体比例的分配,低阻力通道流速大,经过下一个的环形结构时又会产生新的流体分配,在环形结构处重复进行微流体分配以实现微流体的均匀混合。

单独对环形结构建模并分析流线变化,如图 2(a)~2(c)所示,随着 TFR 从 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  增大到 804  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,环形结构处混合效果不断增强。如图 2(a)所示,当 TFR 为 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  时,微流体保持层流流动,两相物质交换依赖分子间扩散。如图 2(b)和 2(c)所示,当 TFR 为 552、804  $\mu\text{L}/\text{min}$  时,微流体发生垂直于流动层面的径向流动,破坏层流状态,增强混合,且该径向流动随流速增大而增强。该环形结构处的流线图证实增强混合的另一个原因在于生成了 Dean 涡旋<sup>[15-16]</sup>。现象产生的原因是微流体沿环形通道流动时受到离心力的作用,微流体沿垂直圆心向外的方向产生二次流动。在环形内部时微流体受到的向心力不足以维持其环形流动,微流体向涡旋中心外径向流动,到达环形外部时,再沿涡旋中心返回环形内部。这种类似于“拧麻花”样式的横向旋转-返回的结构破坏了微流体的层流状态,微流体在该混合过程中反复经历“拉伸-压缩”的过程,从而增强混合效果。

### 2.2 Lut Lips 粒径分析

2.2.1 TFR 对粒径的影响 如图 3(a)所示,当 TFR 从 1500  $\mu\text{L}/\text{min}$  增加到 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$  时,粒径从 692.8 nm 减少至 198.6 nm。统计学分析结果表明, TFR 对脂质体粒径的影响具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。TFR 的增加可能导致更高的剪切力,从而促进脂质体的均匀

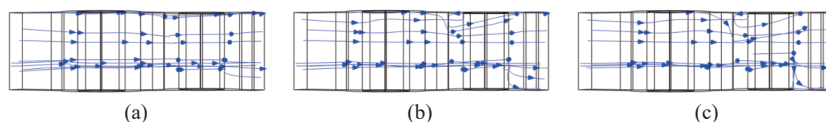


图 2 TFR 为 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  (a)、552  $\mu\text{L}/\text{min}$  (b)、804  $\mu\text{L}/\text{min}$  (c) 时引发的 Dean 涡旋

Fig. 2 Dean vortices induced under 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  (a), 552  $\mu\text{L}/\text{min}$  (b), and 804  $\mu\text{L}/\text{min}$  (c) of TFR

化和更小粒径的形成。在较低的流速下,脂质体的形成可能较为缓慢,容易形成较大的颗粒;而随着流速的增加,溶剂交换的速率增大,脂质体迅速形成并达到更小的粒径。流速越高,脂质体的粒径越小。由此可见,在本文的流速范围内,较高的流速能有效控制脂质体的大小,减少粒径分布的不均匀性。在 TFR 为 1500~3000  $\mu\text{L}/\text{min}$  范围内,脂质体粒径随 TFR 的增大而减小。当 TFR=2700  $\mu\text{L}/\text{min}$  时,脂质体的平均粒径为(219.2 $\pm$ 5.4)nm, PDI 为 0.133 $\pm$ 0.067;当 TFR 增大至 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$  时,粒径进一步减小至(198.6 $\pm$ 1.8)nm,但 PDI 增大至 0.181 $\pm$ 0.056。继续增大 TFR 虽然可能获得更小的粒径,但 PDI 有可能超过 0.2,不再属于单分散体系。同时,当 TFR 为 3300  $\mu\text{L}/\text{min}$  时,芯片会发生渗漏甚至损坏,难以获得可重复的实验结果,即已超过装置承压极限。因此,在本实验条件下,3000  $\mu\text{L}/\text{min}$  既是可实现的最大稳定流速,也是获得较小粒径的最优条件。

**2.2.2 FRR 对粒径的影响** 如图 3(b)所示,当 FRR 从 2 增大到 7 时,粒径从 390.6 nm 减少至 198.6 nm。统计分析显示,FRR 对脂质体粒径的影响具有显著性差异( $p < 0.05$ )。随着 FRR 的增大,水相流速增大,脂质相流速减小。随着水相流速的增大,溶剂的稀释速度加快,脂质体的自组装过程变得更加迅速且均匀。FRR 增大可能使溶剂交换更加迅速,减小了脂质体的形成时间,从而使脂质体粒径更小。较高的 FRR 能够加速溶剂的稀释,有助于脂质体形成较小的颗粒。

**2.2.3 磷脂固醇比对粒径的影响** 如图 3(c)所示,当

磷脂固醇比从 10:1 减小到 1:1 时,脂质体粒径从 128.5 nm 增大至 367.1 nm。统计分析显示,磷脂固醇比对粒径具有显著影响( $p < 0.05$ )。磷脂固醇比越大,脂质体的粒径越小,这可能是由于较高的磷脂固醇比形成的磷脂膜有更好的流动性和较低的刚性,容易形成尺寸较小的脂质体。胆固醇的含量对脂质体膜的流动性和刚性有重要影响。在较高的磷脂固醇比下,脂质体膜表现出更高的流动性,这可能导致膜的结构不稳定,从而形成小粒径的脂质。随着磷脂固醇比的降低,膜的刚性和稳定性逐渐增强,提高了脂质体的粒径。适量的胆固醇增强了膜的稳定性,防止了脂质体的过度流动,从而增大粒径。

### 2.3 Lut Lips 包封率优化

**2.3.1 标准曲线建立** Lut 的 HPLC 图如图 4 所示,在该分析条件下 Lut 分离效果良好。

基于表 1 的 Lut 检测数据,绘制了峰面积与 Lut 质量浓度的标准曲线,Lut 在 0.01~0.10 mg/mL 质量浓度范围内呈现良好的线性关系,回归方程见式(3)。色谱图中的微小峰经空白溶剂对照确认为溶剂峰,不干扰测定。

$$y = 418\,967x + 28\,131, \quad R^2 = 0.999 \quad (3)$$

其中, $y$  为峰面积, $x$  为 Lut 质量浓度。

**2.3.2 Lut Lips 包封率分析** 不同因素对 Lut Lips 包封率的影响如图 5(a)所示,当 FRR 从 3 提高到 7 时,包封率先从 48.28% 提高到 60.95%,再降低至 44.10%,即在 FRR=4 时,包封率达到最高。统计分析显示,不同 FRR 条件下包封率的变化具有显著性差异( $p < 0.05$ )。

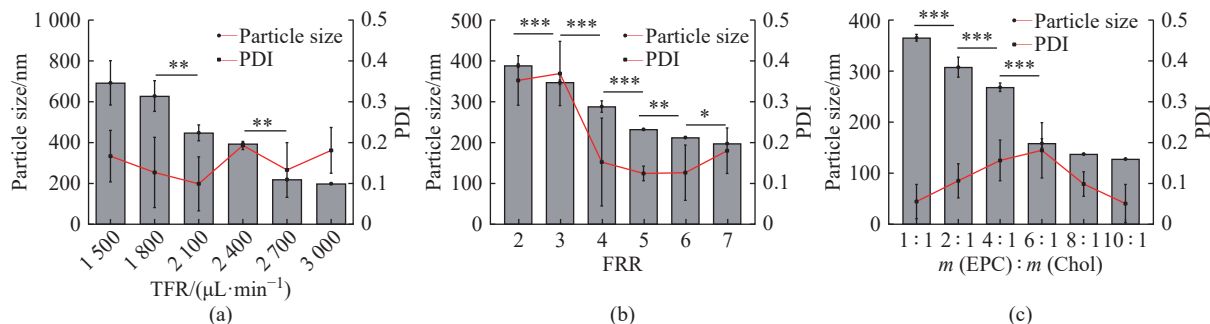


图 3 不同因素对 Lut Lips 粒径和 PDI 的影响: (a) TFR; (b) FRR; (c) 磷脂固醇比 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 4$ )

Fig. 3 Effects of different factors on particle size and PDI of Lut Lips: (a) TFR; (b) FRR; (c) Phospholipid-to-cholesterol mass ratio (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 4$ )

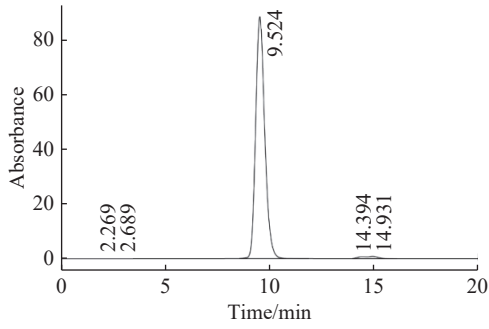


图 4 Lut 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatogram of Lut

表 1 HPLC 测定木犀草素的校正曲线数据

Table 1 Calibration curve data of Lut determined by HPLC

$\rho(\text{Lut})(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	Peak area		
0.01	3937285	4114922	4248606
0.02	8598820	8391720	8264159
0.05	20245827	21983910	21379416
0.08	34964241	33148562	32281729
0.10	40317815	41549236	43789836

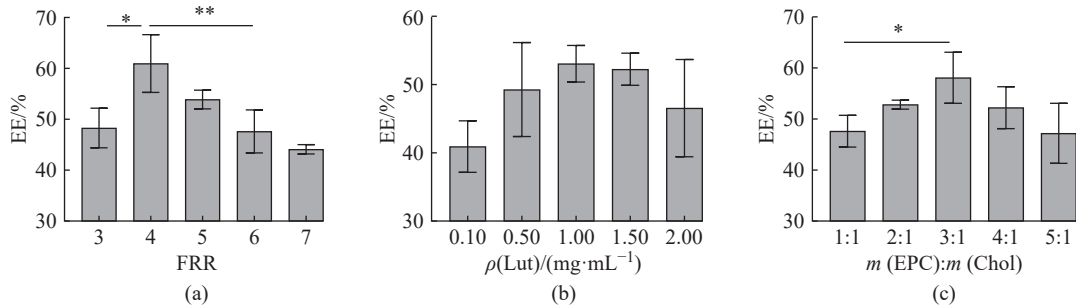


图 5 不同因素对 Lut Lips 包封率的影响: (a)FRR; (b)Lut 质量浓度; (c)磷脂固醇质量比 (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ;  $n=3$ )

Fig. 5 Effects of different factors on EE of Lut Lips: (a) TFR; (b) Lut mass concentration; (c) Phospholipid-to-cholesterol mass ratio (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ;  $n=3$ )

随着 Lut 质量浓度的增加,包封率最初呈现上升趋势,这是因为较高质量浓度的 Lut 使得更多的药物分子能够被有效包埋到脂质体的磷脂双分子层中,从而提高了包封率。在这个阶段,脂质体的磷脂层能容纳更多的药物分子,增强了其负载能力,因此包封率提高。然而,随着 Lut 质量浓度进一步增加,磷脂层能够夹带的药物达到饱和,无法继续有效包裹更多的药物分子。这时,过多的 Lut 无法掺入脂质体磷脂双分子层中,同时也可能影响脂质体的稳定性,导致膜结构的不稳定,最终使得包封率出现下降。因此,虽然差异不显著,但结合趋势分析,在 TFR=3000  $\mu\text{L}/\text{min}$ 且 FRR=4 的优化条件下,本文确定 Lut 质量浓度 1.00 mg/mL 为较优制备条件。

如图 5(c)所示,当磷脂固醇比从 1:1 提高至

较高或较低的 FRR 均导致脂质体自组装过程失稳,从而影响脂质体包封效率<sup>[17]</sup>。这是因为在较低的 FRR(如 FRR=3)下,较慢的水相流入速度会导致脂质体的结构不稳定,影响其包封能力,最终导致较低的 EE。当 FRR 过高(如 FRR=7)时,一方面导致了极高的剪切力,使得脂质分子来不及进行有序的自组装,转而形成胶束或碎片等非囊泡结构,表现为高 FRR 条件下脂质体的 PDI 增大;另一方面,水相流入速度过快,脂质分子在膜中的排列和融合时间不足,脂质膜形成不均匀,部分药物分子无法被有效包封,致使疏水性药物(Lut)分子在组装完成前即被排出体系,从而降低了包封率。因此,在 TFR 固定为 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$  的条件下,本研究确定最佳 FRR 为 4。

如图 5(b)所示,随着 Lut 的质量浓度从 0.10 mg/mL 提高到 2.00 mg/mL, Lut Lips 的包封率从 40.92% 先提高至 53.05% 再降低至 46.55%,在 Lut 质量浓度为 1.00 mg/mL 时包封率达到最高。统计分析显示,各组分差异不显著( $ns, p > 0.05$ )。

5:1 时, Lut 的包封率从 47.61% 提升至 58.09%,再降低至 47.19%,在磷脂固醇比为 3:1 时包封率达到最高。统计分析结果显示,不同磷脂固醇比间存在显著差异( $p < 0.05$ )。

胆固醇对调节脂质体膜的流动性和刚性有重要作用<sup>[18-19]</sup>。在磷脂固醇比较低(1:1)时,过多的胆固醇分子嵌入磷脂双分子层中,使得磷脂层在流动性降低的同时挤占 Lut 的空间,导致包封率降低。随着磷脂固醇比的提高,磷脂层流动性得到改善,提高了 Lut 的包封率。当磷脂固醇比进一步提高(5:1)时,磷脂膜体现出更高的流动性,这可能导致膜结构的不稳定,从而影响脂质体的包封能力,最终导致包封率降低。因此,在 TFR 为 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、FRR 为 4 且 Lut 质量浓度为 1.00 mg/mL 的条件下,本文确定磷脂

固醇比 3 : 1 为最优配比。

综上所述,合理调节 FRR、Lut 质量浓度、磷脂固醇比对于优化 Lut Lips 的粒径和包封率至关重要。通过以上实验,确定优化条件为: TFR=3 000  $\mu\text{L}/\text{min}$ , FRR=4,  $\rho(\text{Lut})=1.00 \text{ mg}/\text{mL}$ ,  $\rho(\text{EPC})=10 \text{ mg}/\text{mL}$ ,  $m(\text{EPC}) : m(\text{Chol})=3 : 1$ 。统计分析表明, TFR、FRR 与磷脂固醇比对粒径具有显著影响( $p < 0.05$ ),而包封率中仅 FRR 与磷脂固醇比部分组间存在显著性差异。综合考虑粒径最小化、PDI 单分散性及包封率的稳定性,该参数组合实现了性能的最优平衡。在该优化参数下,得到了粒径( $220.5 \pm 3.8 \text{ nm}$ ),包封率为  $64.72\% \pm 1.12\%$  的 Lut Lips,且具有良好的单分散性(PDI 为  $0.037 \pm 0.009$ )。

本文以薄膜分散法作为对照,制得的 Lut Lips 粒径为( $312.0 \pm 6.9 \text{ nm}$ ),PDI 为  $0.252 \pm 0.036$ 。为进一步减小粒径并改善分布,对样品进行多次机械挤出处理,最终获得粒径为( $180.5 \pm 0.7 \text{ nm}$ ),PDI 为  $0.122 \pm 0.024$  的 Lut Lips。这一结果表明,采用薄膜分散法在未经挤出优化的情况下粒径偏大且分布较宽,通常需额外的后处理步骤(如高压均质或膜挤出)来获得较窄的分布。而本研究所采用的微流控法能够在一次制备过程中直接获得粒径为( $220.5 \pm 3.8 \text{ nm}$ ),PDI 为  $0.037 \pm 0.009$  的 Lut Lips,显著提高了制备效率,体现出微流控技术在纳米脂质体制备中的优势。因此,本文后续的检测和性能评价均只采用上述微流控方法制备的 Lut Lips。

图 6 是不同放大倍数下 Lut Lips 的 TEM 图。在图 6(a)中,Lut Lips 呈均匀球形,边界清晰,分散性好,无明显聚集和融合。图 6(b)中单个脂质体的高倍图像中磷脂双层和内部水相核心清晰可见,证实了本文开发的微流控装置制备脂质体的可行性。

#### 2.4 RB-Lips 吞噬分析

细胞成像如图 7 所示,可以看出,空白对照组(即无脂质体组)和阴性对照组(即无荧光标记脂质体)的 HaCaT 细胞在明场下呈现正常形态,两组细胞形态无区别,细胞排列规则、无明显异常,说明共培养条件下细胞状态良好。HaCaT 细胞与 RB-Lips 共培养 24 h 后(图 7(c)、7(d)),在荧光显微镜下清晰地观察到强烈的红色荧光信号。这个现象表明,负载罗丹明 B 的脂质体已经成功地被 HaCaT 细胞摄取。罗丹明 B 作为一种荧光标记物,其红色荧光信号能够有效地指示脂质体在细胞内的分布和吞噬情况<sup>[20]</sup>。通过这个实验,我们能够进一步确认脂质体作为药物载体的可行性和有效性。

脂质体与细胞膜的磷脂双层结构高度相似,使

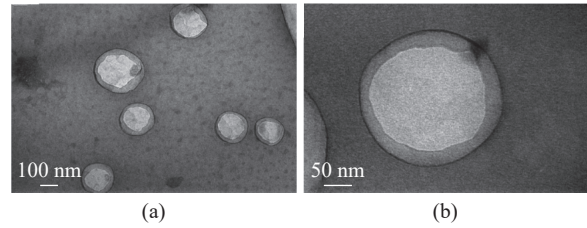


图 6 不同放大倍数下 Lut Lips 的 TEM 图

Fig. 6 TEM images of Lut Lips at different magnifications

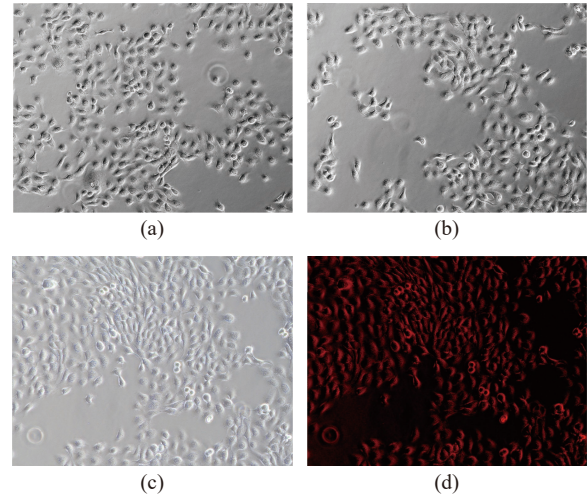


图 7 细胞成像图: (a)空白对照(无脂质体)明场; (b)阴性对照(无荧光标记脂质体)明场; (c)RB-Lips 明场; (d)RB-Lips 荧光图

Fig. 7 Cellular imaging: (a) Bright-field of blank control (cells without Lips); (b) Bright-field of negative control (cells treated with non-fluorescent labeled liposomes); (c) Bright-field of RB-Lips group; (d) Fluorescence image of RB-Lips group

其能够与细胞膜发生相互作用并顺利地被细胞摄取。此次实验结果表明,HaCaT 细胞在共培养过程中能够有效地识别和吞噬 RB-Lips,证明了脂质体能够顺利通过细胞膜将药物递送到细胞内。

#### 2.5 细胞毒性分析

Lut 及 Lut Lips 对 HaCaT 细胞活力的影响如图 8

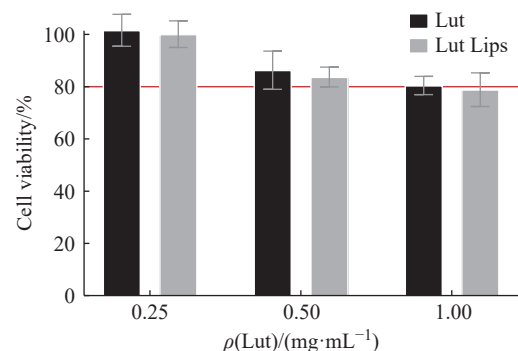


图 8 Lut 及 Lut Lips 对 HaCaT 细胞活力的影响( $ns; n = 4$ )

Fig. 8 Effects of Lut and Lut Lips on the viability of HaCaT cells ( $ns; n = 4$ )

所示,可以看出,随着培养基中 Lut 质量浓度的升高,细胞活力呈下降趋势。当 Lut 质量浓度为 0.25~1.00 mg/mL 时, Lut 组与 Lut Lips 组之间无显著性差异( $ns, p > 0.05$ ),细胞活力均保持在 80% 以上。当 Lut 质量浓度不小于 0.50 mg/mL 时存在细胞毒性,对应的 Lut Lips 组也观察到同等程度的细胞影响,但没有观察到脂质体带来的额外效应。总体结果表明, Lut Lips 在质量浓度低于 1.00 mg/mL 时对 HaCaT 细胞表现出良好的生物相容性。

### 3 结 论

(1)本文设计的环形微流控装置可以引发 Dean 涡旋增强混合效果, TFR 越高涡旋越剧烈,混合效果越好。实验结果表明,较高的 TFR 和 FRR 可促进磷脂分散,获得更小粒径;磷脂固醇比通过调节脂质层流动性调控粒径,它升高时流动性增强,粒径减小。FRR 和 Lut 质量浓度显著影响包封率,适当的 FRR 有利于脂质体稳定形成并提高包封率; Lut 质量浓度存在饱和点(1.00 mg/mL),超过后包封率下降。磷脂固醇比过高(流动性强)或过低(胆固醇过多)均会降低包封率。在最终优化条件(TFR=3 000  $\mu$ L/min, FRR=4,  $\rho$ (Lut)=1.00 mg/mL,  $\rho$ (EPC)=10 mg/mL,  $m$ (EPC): $m$ (Chol)=3:1)下,得到粒径 220.5 nm、包封率 64.72% 的 Lut Lips,单分散性优异(PDI=0.037)。

(2)RB-Lips 吞噬实验证明, HaCaT 细胞可高效吞噬罗丹明 B 标记的脂质体,脂质体凭借其仿生膜结构特性,展现出优异的细胞膜穿透能力和药物递送效率。细胞活力实验结果表明, Lut Lips 在低质量浓度(<1.00 mg/mL)条件下对细胞活力影响不显著。该研究从细胞水平验证了脂质体作为药物载体的可行性,为其在药物递送领域的应用提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 袁进文. 木犀草素对外源性污染物诱导的肠上皮屏障和肝细胞损伤的改善作用研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [2] FAN X, DU K, LI N, *et al.* Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of luteolin in mice[J]. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 2018, 37(4): 351-364.
- [3] FUNARO A, WU X, SONG M, *et al.* Enhanced anti-inflammatory activities by the combination of luteolin and tangeretin[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(5): H1320-H1327.
- [4] PU Y, ZHANG T, WANG J, *et al.* Luteolin exerts an anticancer effect on gastric cancer cells through multiple signaling pathways and regulating miRNAs[J]. Journal of Cancer, 2018, 9(20): 3669-3675.
- [5] TAWORNCHAT P, PATTARAKANKUL T, PALAGA T, *et al.* Polymerized luteolin nanoparticles: Synthesis, structure elucidation, and anti-inflammatory activity[J]. ACS Omega, 2021, 6(4): 2846-2855.
- [6] WANG R, LI X, XU Y, *et al.* Progress, pharmacokinetics and future perspectives of luteolin modulating signaling pathways to exert anticancer effects: A review[J]. Medicine, 2024, 103(34): e39398.
- [7] LUO Y, CHEN S, ZHOU J, *et al.* Luteolin cocrystals: Characterization, evaluation of solubility, oral bioavailability and theoretical calculation [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2019, 50: 248-254.
- [8] SHAKEEL F, HAQ N, ALSHEHRI S, *et al.* Solubility, thermodynamic properties and solute-solvent molecular interactions of luteolin in various pure solvents [J]. Journal of Molecular Liquids, 2018, 255: 43-50.
- [9] XU J, JI H, ZHANG G, *et al.* Virtual screening and experimental validation of luteolin cocrystals for enhanced solubility [J]. Journal of Molecular Structure, 2025, 1337: 142207.
- [10] CAZZOLLA A, MONDALA J R M, WANIGASEKARA J, *et al.* Synthesis of cationic liposome nanoparticles using a thin film dispersed hydration and extrusion method[J]. Plos One, 2024, 19(4): e0300467.
- [11] LIU J, WANG A, LIU X, *et al.* Ultrasmall polymer nanoparticles formed by instantaneous nanosplitting of surfactant-free emulsion[J]. Langmuir, 2020, 36(27): 7933-7942.
- [12] LEUNG S S Y, MORALES S, BRITTON W, *et al.* Microfluidic-assisted bacteriophage encapsulation into liposomes[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2018, 545(1/2): 176-182.
- [13] ALAN R, SARATH C C, ANOOP N V, *et al.* Lipid-based vesicles: A non-invasive tool for transdermal drug delivery[J]. Journal of Pharmaceutical Innovation, 2022, 17(3): 1039-1052.
- [14] AL-AMIN M D, BELLATO F, MASTROTTO F, *et al.* Dexamethasone loaded liposomes by thin-film hydration and microfluidic procedures: Formulation challenges[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1611.
- [15] CHEN J J, CHEN C H, SHIE S R. Optimal designs of staggered dean vortex micromixers [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(6): 3500-3524.
- [16] YONG C K, EDELSTEIN W A, BELFORT G. Dean vortices with wall flux in a curved channel membrane system[J]. Journal of Membrane Science, 1993, 81(1): 151-162.

- [17] KRISHNA V, CHITTURI H, VENUGANTI V V K. Process optimization for preparation of curcumin and quercetin co-encapsulated liposomes using microfluidic device[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2024, 28(8): 17.
- [18] 刘琦. 微流控技术牡荆素脂质体的制备及光热和光动力协同抗肿瘤研究 [D]. 江苏镇江: 江苏大学, 2023.
- [19] GARCÍA M C, NAITLHO N, CALDERÓN-MONTAÑO J M, *et al.* Cholesterol levels affect the performance of AuNPs-decorated thermo-sensitive liposomes as nanocarriers for controlled doxorubicin delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(7): 973.
- [20] KOSHKARYEV A, THEKKEDATH R, PAGANO C, *et al.* Targeting of lysosomes by liposomes modified with octadecyl-rhodamine B[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2011, 19(8): 606-614.

## Controlled Fabrication of Luteolin-Loaded Liposomal Nanoparticles for Drug Delivery Systems

SONG Meng, CEN Lian

(School of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** A circular microfluidic device was developed using a microfluidic approach combined with numerical simulation and experimental validation to successfully construct and regulate the performance of luteolin-loaded liposomes (Lut Lips). The effects of operational parameters, including total flow rate and flow rate ratio, on the mixing performance of the microfluidic device were systematically investigated, as well as the influence of formulation variables, including mass ratio of phospholipid-to-cholesterol and mass concentration of luteolin, on liposome particle size and luteolin encapsulation efficiency. Under optimized conditions, Lut Lips with a particle size of 220.5 nm and an encapsulation efficiency (EE) of 64.72% were obtained, exhibiting excellent monodispersity with a polydispersity index (PDI) of 0.037. Human immortalized keratinocytes (HaCaT) were used as an *in vitro* uptake model and co-incubated with fluorescently labeled liposomal nanoparticles (Lips), demonstrating that the delivery system effectively penetrated the cellular membrane barrier and achieved intracellular drug delivery. The findings of this study confirm the feasibility of liposomal nanoparticles as a novel drug delivery system for luteolin and provide new insights and experimental evidence for the design of delivery systems for luteolin and other lipophilic drugs.

**Key words:** liposomal nanoparticles; microfluidics; luteolin; cellular uptake; drug delivery

(责任编辑: 李娟)